

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

AM

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年3月29日 (29.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/21788 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, 5/10, C07K 14/52, 16/24, G01N 33/53, 33/577, C12P 21/08 (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 後飯塚僚 (GOITSUKA, Ryo) [JP/JP]; 〒113-0022 東京都文京区千駄木2-48-4-705 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/06351 (74) 代理人: 弁理士 西澤利夫 (NISHIZAWA, Toshio); 〒150-0042 東京都渋谷区宇田川町37-10 麻仁ビル6階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2000年9月18日 (18.09.2000) (81) 指定国 (国内): CA, US.

(25) 国際出願の言語: 日本語 (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ: 特願平11/263778 1999年9月17日 (17.09.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: MAST CELL-SPECIFIC SIGNAL TRANSDUCING MOLECULES AND cDNAs THEREOF

(54) 発明の名称: マスト細胞特異的シグナル伝達分子とそのcDNA

(57) Abstract: A protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 which is a signal transducing molecule expressed specifically in mouse mast cells; a protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:4 which is a signal transducing molecule expressed specifically in human mast cells; polynucleotides encoding these proteins; expression vectors carrying these polynucleotides; cells transformed by these expression vectors; and antibodies against the above proteins. These signal transducing molecules are useful in, for example, screening novel drugs against allergic diseases.

(57) 要約:

WO 01/21788 A1

この出願は、マウス・マスト細胞で特異的に発現するシグナル伝達分子であって、配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質と、ヒト・マスト細胞で特異的に発現するシグナル伝達分子であって、配列番号4のアミノ酸配列を有するタンパク質、これらのタンパク質をコードするポリヌクレオチド、これらのポリヌクレオチドを保有する発現ベクター、これらの発現ベクターによる形質転換細胞、ならびに前記タンパク質に対する抗体を提供する。この発明によって提供されるシグナル伝達分子は、アレルギー疾患に対する新規薬剤のスクリーニング等に有用である。

明細書

マスト細胞特異的シグナル伝達分子とその cDNA

5 技術分野

この出願の発明は、マウスおよびヒトの各々のマスト細胞で特異的に発現するシグナル伝達分子と、このタンパク質分子をコードするポリヌクレオチド（cDNA）に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、例えばアレルギー疾患の治療薬剤をスクリーニングする際の標的分子等として有用な新規タンパク質と、このタンパク質を生産やその機能解析等に有用な各種遺伝子工学材料に関するものである。

背景技術

I型アレルギー反応は、主にマスト細胞および好塩基球で発現される高親和性の IgE レセプターが、IgE 抗体とアレルゲンにより架橋されることを介して、ヒスタミンやセロトニン等を含む顆粒を放出することによって引き起こされる複雑な免疫反応である。そしてこの反応は以下の 3 つの過程から構成されることが明らかにされている。

- A) アレルゲンの刺激による T 細胞からの IL-4 や IL-5 等のサイトカインの产生と、それによって誘導される B 細胞による IgE 抗体の产生やマスト細胞の分化・増殖等の初期過程。
- B) IgE 抗体およびアレルゲンによる Fc ϵ レセプターの架橋からマスト細胞の脱顆粒にいたる中期過程。
- C) 脱顆粒後のヒスタミンやセロトニン等による血管透過性亢進等の後期過程。

25

一方、この出願の発明者らは、B 細胞系列に特異的に発現するアダプター分子、BASH を単離している (J. Immunol. 161:5804-5808, 1998)。この BASH は、T 細胞で発現する SLP-76 (J. Biol. Chem. 270:7029-7032, 1995) と分子構造的に類似して

おり、その構造および機能解析を通して、血球系列・免疫レセプターに特異的なシグナル伝達分子ファミリーが存在することを示している。

現在のところ、アレルギーの治療法としては、減感作療法などのB細胞によるIgE抗体産生（初期過程）の抑制、あるいは抗ヒスタミン剤等の投与による後期課程の抑制が行われているが、いずれも効果的な治療法とはなっていないのが現状である。

一方、前記のとおり、下型アシルギー反応の分子機構について一部が明らかになりつつある。しかしながら、高親和性IgEレセプターを介したマスト細胞の脱顆粒に関与するシグナル伝達の機構については知られていない。このマスト細胞の脱顆粒プロセスに関与する分子を明らかにすることは、アレルギー反応の分子機構を解明するためばかりでなく、アレルギー疾患の治療方法あるいは治療薬剤を開発するためにも不可欠である。特に、マスト細胞はアレルギー症状発現の根幹であることから、このマスト細胞に特異的に発現するシグナル伝達分子は、ヒスタミンやセロトニン等の脱顆粒反応に至るFcεレセプターシグナル伝達系を選択的に遮断する新しい抗アレルギー剤の開発にとって極めて重要である。

この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、マウスおよびヒトの各々のマスト細胞で特異的に発現するシグナル伝達分子と、このタンパク質分子をコードするポリヌクレオチド（cDNA）を提供することを課題としている。

またこの出願の発明は、前記のシグナル伝達分子に関する各種の遺伝子工学材料を提供することを課題としている。

25 発明の開示

この出願は、前記の課題を解決するものとして、以下の(1)～(10)の発明を提供する。

(1) マウス・マスト細胞で特異的に発現するシグナル伝達分子であって、配列番号

2のアミノ酸配列からなる精製タンパク質。

(2) ヒト・マスト細胞で特異的に発現するシグナル伝達分子であって、配列番号4のアミノ酸配列を有する精製タンパク質。

(3) 配列番号1の塩基配列からなり、発明(1)のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(4) 配列番号3の塩基配列を有し、発明(2)のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(5) 発明(3)のポリヌクレオチドを保有する発現ベクター。

(6) 発明(4)のポリヌクレオチドを保有する発現ベクター。

(7) 発明(5)の発現ベクターによる形質転換体であって、発明(1)のタンパク質を生産しうる形質転換細胞。

(8) 発明(6)の発現ベクターによる形質転換体であって、発明(2)のタンパク質を生産しうる形質転換細胞。

(9) 発明(1)のタンパク質に対する抗体。

(10) 発明(2)のタンパク質に対する抗体。

図面の簡単な説明

図1は、血球系列細胞および非血球系列細胞におけるMIST、BASHおよびSLP-76の発現を調べたノーザンプロット分析の結果である。18-18はB前駆細胞、WEHI1279はB細胞、L1210はBリンパ球前駆細胞、J558LおよびP3U1は形質細胞、EL-4およびBW5147はT細胞、P388D1およびWEHI3はマクロファージ、P815はマスト細胞、B8/3は赤芽球細胞、そしてB16、Y1、NIH3T3およびES-E14は非血球系列細胞である。

図2は、マウスおよびヒトMISTの発現を様々な血球系列細胞で調べたRT-PCR分析の結果である。

図3および図4は、Nc/Ngaマウスのアトピー性皮膚炎における炎症マスト細胞でのMIST発現を調べた免疫組織分析の結果である。

図5は、野生型MISTまたは変異型MISTを発現するRBL-2H3クローンの脱顆粒

反応の結果である。

発明を実施するための最良の形態

この出願の発明者は、EST データベースのスクリーニングによって、13.5 日齢の
5 マウス胎児 cDNA の EST クローン (GenBank accession No. AA166259) が、ニワ
トリ BASH (J. Immunol. 161:5804-5808, 1998) の SH2 ドメインと高い相同意を有
することを見出し、さらにこのクローンの 1.8 kb mRNA が、BASH や SLP-76 を発
現する他の血球系列細胞や非血球系列細胞 (B 細胞、T 細胞、マクロファージ等) で
は発現せず、マスト細胞株 P815 でのみ発現することを見出した (図 1)。そして、
10 このような特異的発現パターンと、後記するその機能から、このタンパク質分子を
MIST (Mast Cell-specific Immunoreceptor Signal Transductor) と命名し、この出願
15 の発明を完成させた。

以下、この出願の各発明について、実施形態を詳しく述べ説明する。

15 この出願の発明(1)および(2)の MIST は、各々、マウスおよびヒトのマスト細胞で
特異的に発現するタンパク質である。発明(1)のマウス MIST は発明(3)のポリヌクレ
オチド (完全長 cDNA : 配列番号 1) にコードされているタンパク質である。一方、
発明(2)のヒト MIST は、配列番号 3 (部分 cDNA) を含む発明(4)のポリヌクレオチ
ドにコードされているタンパク質である。

20 本発明の MIST は、各々、マウスおよびヒトのマスト細胞で特異的に発現する。

発明(1)のマウス MIST および発明(2)のヒト MIST は、各々マウスおよびヒトの臓
器、細胞株などから単離する方法、この出願によつて提供されるアミノ酸配列に基
づき化学合成によってペプチドを調製する方法、あるいは前記発明(3)および(4)のポ
リヌクレオチドを用いて組換え DNA 技術で生産する方法などにより取得するこ
25 ができるが、組換え DNA 技術で取得する方法が好ましく用いられる。例えば、前記発
明(3)および(4)のポリヌクレオチドを有するベクターからインビトロ転写によって
RNA を調製し、これを鋸型としてインビトロ翻訳を行なうことによりインビトロで
MIST を発現できる。また翻訳領域を公知の方法により適当な発現ベクターに組換え

ることにより、大腸菌、枯草菌等の原核細胞や、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞、植物細胞等の真核細胞で、ポリヌクレオチドがコードしているマウス MIST およびヒト MIST を大量に発現させることができる。

5 前記発明(3)のポリヌクレオチド(配列番号 1)は、化学合成による方法やマウス cDNA ライブラリーをスクリーニングする方法などを用いて取得することができる。 cDNA ライブラリーから目的のポリヌクレオチドをクローニングするには、この出願によつて提供される配列番号 1 の任意部分の塩基配列に基づいてオリゴヌクレオチドを合成し、これをプローブとして用いて、公知の方法によりコロニーあるいはプラ 10 ークハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行えばよい。また、目的とするポリヌクレオチドの両末端にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーとして用いて、マウス細胞から単離したゲノム DNA を鋳型とする PCR 法により、前記発明(3)のポリヌクレオチドを調製することもできる。

一方、発明(4)のポリヌクレオチドは、この出願によつて提供される配列番号 3 の 15 任意部分の塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドを用いたハイブリダイゼーション・スクリーニングや PCR により完全長 cDNA を単離することによって調製することができる。

MIST をインビトロ翻訳でポリヌクレオチドを発現させて生産させる場合には、例 20 えば前記発明(3)または(4)のポリヌクレオチドを、RNA ポリメラーゼプロモーターを 有するベクターに組換え[発明(5)(6)]、プロモーターに対応する RNA ポリメラーゼを 25 含むウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などのインビトロ翻訳系に添加すれば、マウスおよびヒトの MIST をそれぞれインビトロで生産することができる。RNA ポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6 などが例示できる。これらの RNA ポリメラーゼプロモーターとしては、pKA1、pCDM8、pT3/T7 18、pT7/3 19、pBluescript II などが例示できる。

MIST を大腸菌などの微生物でポリヌクレオチドを発現させて生産させる場合に

は、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リポソーム結合部位、DNA クローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに、前記発明(3)または(4)のポリヌクレオチドを翻訳領域を組み換えた発現ベクター〔発明(5)(6)〕を作成し、この発現ベクターで宿主細胞を形質転換したのち、得られた形質転換体〔発明(7)(8)〕を培養すれば、これらのポリヌクレオチドがコードしている MIST を微生物内で大量生産することができる。この際、任意の翻訳領域の前後に開始コドンと停止コドンを付加して発現させれば、任意の領域を含む MIST 断片を得ることができる。あるいは、他の蛋白質との融合蛋白質として発現させることもできる。この融合蛋白質を適当なプロテアーゼで切断することによってこの cDNA がコードする蛋白質部分のみを取得することもできる。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC 系、pBluescript II、pET 発現システム、pGEX 発現システムなどが例示できる。

MIST を真核細胞でポリヌクレオチドを発現させて生産させる場合には、前記発明(3)または(4)のポリヌクレオチドを、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに組換える〔発明(5)(6)〕、真核細胞内に導入すれば〔発明(7)(8)〕、MIST を真核細胞内で生産することができる。発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBV ベクター、pRS、pYES2 などが例示できる。また、pIND/V5-His、pFLAG-CMV-2、pEGFP-N1、pEGFP-C1 などを発現ベクターとして用いれば、His タグ、FLAG タグ、GFP など各種タグを付加した融合タンパク質として発現させることもできる。真核細胞としては、サル腎臓細胞 COS7、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO などの哺乳動物培養細胞、出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞などが一般に用いられるが、MIST を発現できるものであれば、いかなる真核細胞でもよい。発現ベクターを真核細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAE テキストラン法など公知の方法を用いることができる。

MIST を原核細胞や真核細胞で発現させたのち、培養物から目的タンパク質を単離

精製するためには、公知の分離操作を組み合わせて行うことができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどがあげられる。

発明(1)のマウス MIST および発明(2)のヒト MIST には、それぞれ配列番号 2 および 4 のアミノ酸配列のいかなる部分アミノ酸配列からなるペプチド断片（5 アミノ酸残基以上）も含まれる。これらのペプチド断片は抗体を作製するための抗原として用いることができる。また、発明(1)および(2)の MIST は、翻訳された後、細胞内で各種修飾を受ける。じたがって、これらの修飾されたタンパク質もこの出願の発明の範囲に含まれる。このような翻訳後修飾としては、N 末端メチオニンの脱離、N 末端アセチル化、糖鎖付加、細胞内プロテアーゼによる限定分解、ミリストイル化、イソプレニル化、リン酸化などが例示できる。

15

また、一般に動物遺伝子は個体差による多型が頻繁に認められる。従って配列番号 1 および 3 の塩基配列において、1 または複数個のヌクレオチドの付加、欠失および／または他のヌクレオチドによる置換がなされているポリヌクレオチドもこの発明の範囲に含まれる。

20

同様に、これらの変更によって生じる 1 または複数個のアミノ酸の付加、欠失および／または他のアミノ酸による置換がなされている MIST も、配列番号 2 および 4 のアミノ酸配列を有する MIST を有する限り、この発明の範囲に含まれる。

25

さらに、発明(3)および(4)のポリヌクレオチドには、各々、配列番号 1 および 3 のいかなる部分塩基配列からなる DNA 断片（10bp 以上）も含まれる。また、センス鎖およびアンチセンス鎖からなる DNA 断片もこの範囲に含まれる。

発明(9)および(10)の抗体は、前記発明(1)および(2)のタンパク質をそれぞれ抗原と

して用いて動物を免役した後、血清から得ることが出来る。抗原としては配列番号 2 または 4 のアミノ酸配列に基づいて化学合成したペプチドや、真核細胞や原核細胞で発現させた MIST それ自体を用いることができる。あるいは、上記の真核細胞用発現ベクターを注射や遺伝子銃によって、動物の筋肉や皮膚に導入した後、血清を 5 採取することによって作製することができる（例えば、特開平 7-313187 号公報記載の方法）。動物としては、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ニワトリなどが用いられる。免疫した動物の脾臓から採取した B 細胞をミエローマと融合させてハイブリドーマを作製すれば、MIST に対するモノクローナル抗体を產生することができる。

10 実施例

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

実施例 1 : cDNA クローニング

15 マウス MIST の完全長 cDNA を、EST クローン (GenBank accession No. AA166259) の配列情報に基づいて作成したプライマーを用い、5'-および 3'-RACE (Marathon cDNA amplification kit, Clontech 社製) により PJ18 cDNA ライブライア から単離した。また、ヒト MIST の部分 cDNA は、文献 (Blood 86:3705-3714, 1995) 記載の方法に従い、IL-6 および幹細胞因子 (SFC: Peprotech 社製) と共に培 20 養したヒト齧帯血由来マスト細胞 (HCMC) から調製した mRNA を鋳型として PCR によって増幅した。

得られた cDNA の配列を公知の方法により決定し、マウス MIST の cDNA は配列番号 1 の塩基配列からなり、またヒト MIST の部分 cDNA は配列番号 3 の塩基配列からなることが確認された。また、マウス MIST は配列番号 2 のアミノ酸配列を有し、分子量は約 60kDa であることが確認された。このマウス MIST には N 末端から中央にかけて、リン酸化される可能性のある Tyr 残基が 8 個認められる。また C 末端には、 BASH や SLP-76 とアミノ酸レベルでそれぞれ 41%、53% の相同性を示す SH2 ドメインが存在する。さらに、MIST 分子中央部には Pro 残基にとむ領域があり、SH3 ド

メイン結合モチーフが認められることから、MIST は典型的なシグナル分子としての特徴を有していることが確認された。

一方、ヒト MIST は、マウス MIST とアミノ酸レベルで約 60%のホモロジーを示した。

5

実施例 2：発現ベクターの構築

実施例 1 で得たマウス MIST の cDNA 翻訳領域を PCR 増幅し、発現ベクター pCATneo (J. Immunol. 161:5804-5808, 1998) の EcoRI-Sal I サイトに挿入し、組換え発現ベクター (pCATneo-MIST-WT) を構築した。

10

また、市販のミューテーションキット (Stratagene 社製) を用いた PCR 変異導入法により、配列番号 2 の 69、96、101、153、174 および 188 位置の Tyr を Phe に置換した変異 MIST (MIST-YF) を調製し、これを発現ベクター pCATneo にサブクローンングして組換え発現ベクター (pCATneo-MIST-YF) を構築した。

15

実施例 3：形質転換細胞の作成

ラットのマスト細胞様細胞株 RBL-2H3 に、実施例 2 で作成した組換え発現ベクター pCATneo-MIST および pCATneo-MIST-YF をそれぞれエレクトロポーレーション法によりトランスフェクトし、形質転換細胞 RBL-2H3-MIST および RBL-2H3-MIST-YF を作成した。

20

実施例 4：抗体の作成

配列番号 2 の 193-435 アミノ酸配列からなるポリペプチドとグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質によって免疫したウサギから抗 MIST 抗体を作成した。先ず、抗血清を GST 結合セファロースビーズで前処理し、

25 次いで、GST-MIST 融合タンパク質を充填したアファニティーカラムで精製した。アファニティー精製抗体の特異性は、マウス MIST の cDNA をトランスフェクトした COS 細胞の溶出物に対する免疫プロット分析により確認した。

実施例 5：各種細胞株における MIST 発現の確認

実施例 1 で得たマウスおよびヒト MIST の発現を RT-PCR により確認した。対象とした細胞は、IL-3 で誘導したマウス骨髓由来のマスト細胞 (BMMC) 、マウス・マスト細胞株 PT18、SCF と IL-6 と共に培養したヒトマスト細胞 (HCNC) 、および他の血球系列細胞 (Jurkat: ヒト T 細胞、Romas: ヒト B 細胞、KU812: ヒト好塩基球前駆細胞、EOL-1: 好酸球前駆細胞) である。

結果は図 2 に示したとおりであり、MIST の発現はマスト細胞 BMMC、PT18 および HCNC において見出されたが、他の細胞株では発現していなかった。

また、アトピー性皮膚炎様の症状を自然発症する Nc/Nga マウス (J. Immunol. 1997; 159: 461-466, 1997) の皮膚切片を、実施例 4 の抗 MIST 抗体で染色し、MIST が *in vivo* 正常マスト細胞で発現しているか否かを検討した。結果は図 3 および図 4 に示したとおりであり、マウスの炎症マスト細胞において MIST 発現が認められた。

以上の結果から、MIST はマスト細胞で特異的に発現するタンパク質であることが確認された。

実施例 6：MIST におけるチロシン・リン酸化の確認

$\text{Fc}\varepsilon\text{RI}$ のシグナル伝達が確認されているラット・マスト細胞株 RBL-2H3 を用い、 $\text{Fc}\varepsilon\text{RI}$ 刺激によって MIST のチロシンがリン酸化されるか否かを検討した。

実施例 3 で作成した形質転換細胞 RBL-2H3-MIST を、 $10\mu\text{g}$ の抗 DNP マウス IgE (シグマ社製) で 1 時間インキュベートし、次いで 100 ng/ml の DNP-HAS で刺激した。細胞を 1% NP 40 溶解バッファーで溶解し、各種の抗体と共に免疫沈降した。

その結果、MIST 分子は、マスト細胞上の $\text{Fc}\varepsilon$ レセプターを IgE および抗原で刺激することにより、チロシンリン酸化され、PLC- γ ならびに Vav 等のシグナル分子と会合することから、 $\text{Fc}\varepsilon$ レセプターの下流に存在するシグナル分子であることが確認された。また、MIST は、マスト細胞に存在するチロシンキナーゼの中で、Lyn キナーゼによって強くリン酸化されたが、この Lyn キナーゼはマスト細胞の脱顆粒において重要な役割を持つことが確認されている。

実施例7：マスト細胞の脱顆粒におけるMIST作用の検討

実施例3で作成した形質転換細胞 RBL-2H3-MIST および RBL-2H3-MIST-YF を用い、MIST および変異型 MIST の過剰発現が細胞の脱顆粒に影響を及ぼすか否かを検討した。

5 細胞を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗 DNP マウス IgE で一晩インキュベートし、PBS で 2 回洗浄した後、DNP-HAS で 37°C 、30 分間刺激した。脱顆粒は、文献 (Int. Immunol. 7:251-258, 1992) 記載の方法により β -hexosaminidase の放出を測定することにより確認した。

結果は図 5 に示したとおりである。野生型の MIST を過剰発現させた場合には、Fc ε レセプター刺激によるマスト細胞の脱顆粒は影響を受けなかったが、変異型 MIST 10 (MIST-YF) の過剰発現は Fc ε レセプターを介したマスト細胞の脱顆粒が有意に抑制された。

以上の結果から、MIST 分子は Fc ε レセプター刺激から脱顆粒に至るシグナル伝達系において重要な役割を果たす分子であることが確認された。

15

産業上の利用可能性

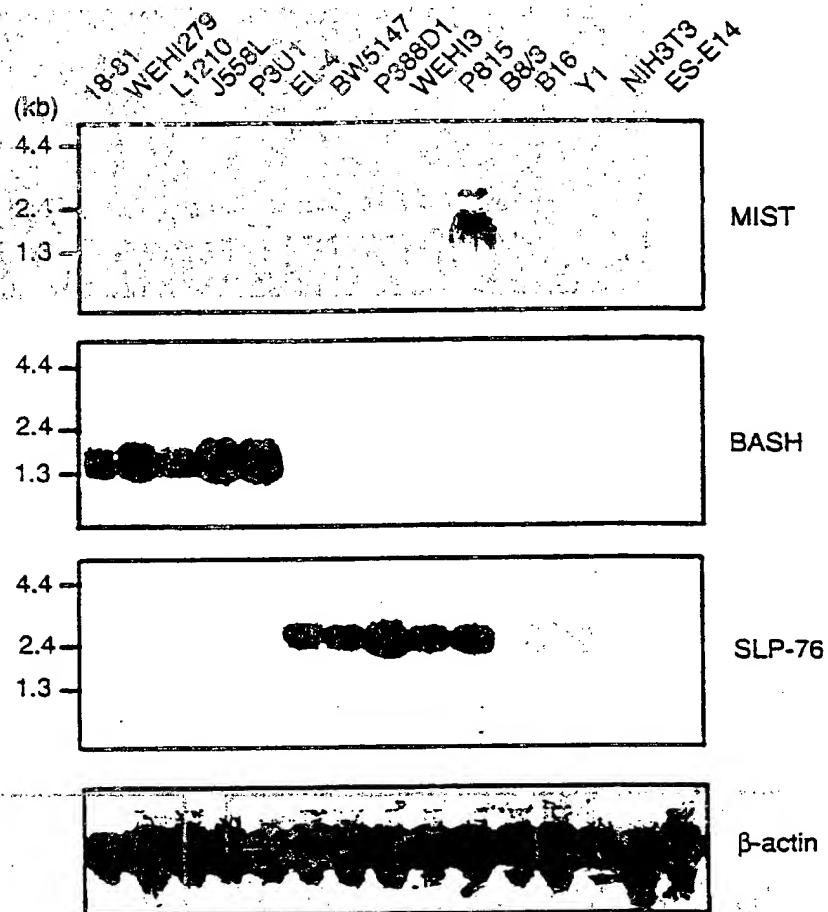
この出願の発明によって、マウスおよびヒトの各々のマスト細胞で特異的に発現するシグナル伝達分子と、このタンパク質分子をコードするポリヌクレオチド (cDNA)、並びにこれらのシグナル伝達分子に関する各種の遺伝子工学材料が提供される。これらのシグナル伝達分子を標的とすることによって、アレルギー疾患に対する新規薬剤のスクリーニング等が可能となる。

請求の範囲

1. マウス・マスト細胞で特異的に発現するシグナル伝達分子であって、配列番号2のアミノ酸配列からなる精製タンパク質。
- 5 2. ヒト・マスト細胞で特異的に発現するシグナル伝達分子であって、配列番号4のアミノ酸配列を有する精製タンパク質。
- 10 3. 配列番号1の塩基配列からなり、請求項1のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。
- 15 4. 配列番号3の塩基配列を有し、請求項2のタンパク質をコードするポリヌクレオチド。
5. 請求項3のポリヌクレオチドを保有する発現ベクター。
6. 請求項4のポリヌクレオチドを保有する発現ベクター。
7. 請求項5の発現ベクターによる形質転換体であって、請求項1のタンパク質20 を生産しうる形質転換細胞。
8. 請求項6の発現ベクターによる形質転換体であって、請求項2のタンパク質を生産しうる形質転換細胞。
- 25 9. 請求項1のタンパク質に対する抗体。
10. 請求項2のタンパク質に対する抗体。

1/3

☒ 1



2/3

図2

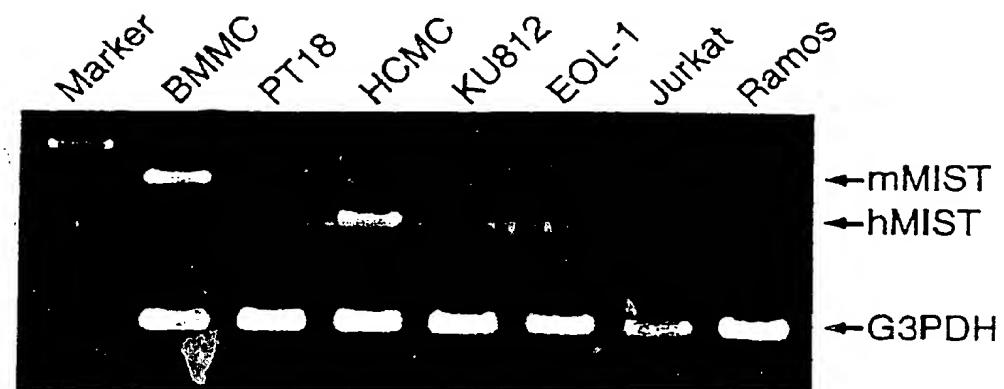


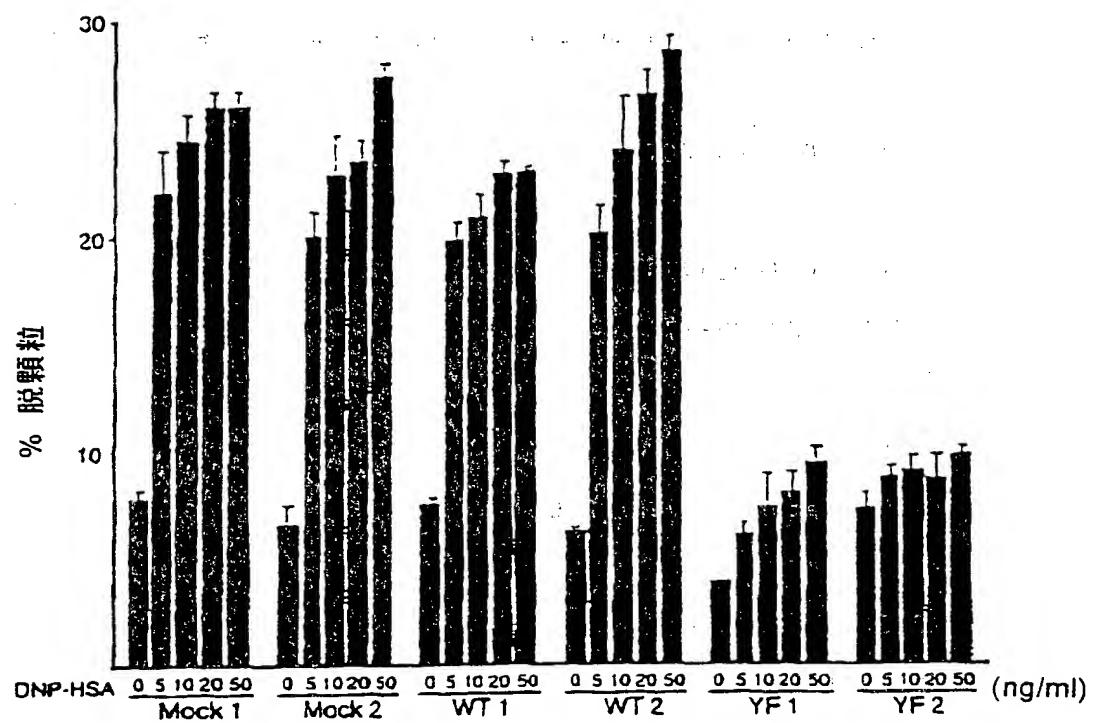
図3

図4



3/3

図5



SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> A mast cell-specific adapter molecules and cDNAs thereof

5

<130> 00-F-047PCT/YS

<150> JP11-263778

<151> 1999-09-17

10

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

15 <211> 1.721

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<220>

<221> CDS

20 <222> (255)..(1562)

<300>

<301> Goitsuka R., et al.

<302> A BASH/SLP-76-related adaptor protein MIST/Clink involved in IgE receptor-mediated mast cell degranuation

25 <303> Int. Immunol.

<304> 12

<305> 4

<306> 573-580

<307> 2000

<308> AB021220

<309> 2000-05-26

5 <400> 1

acgaggccaa actgcccagg tctgtggctg cgtttctcgaa aacccaaaaa ctcacaggc 60

acataacaagg cactctctgc tgaaggactc tgctgaggggg agagaacatgtcaactctat 120

cttacagagt gctccaggat gcgaccgtgg acccccatttc caggagctag ccgtctcaac 180

actgagccct tgactaaagg aagactgagc aggctgagtt gaagatccct ctctttgcc 240

10 aggtgccaag gacc atg acc agc cag ggc aat zaa agg aca acg aaa gaa 290

Met Thr Ser Gln Gly Asn Lys Arg Thr Thr Lys Glu

1 5 10

gga ttc ggt gat ctg aga ttc cag aac gtc tct ctg ctg aaa aat agg 338

Gly Phe Gly Asp Leu Arg Phe Gln Asn Val Ser Leu Leu Lys Asn Arg

15 15 20 25

tca tgg cca agc ctc agc agt gcc aaa ggg cgg tgt cga gcg gtt ctg 386

Ser Trp Pro Ser Leu Ser Ser Ala Lys Gly Arg Cys Arg Ala Val Leu

30 35 40

gaa cca ctt ccg gat dac aga agg aac ttg gct ggg gtc cca ggt gga 434

20 Glu Pro Leu Pro Asp His Arg Arg Asn Leu Ala Gly Val Pro Gly Gly

45 50 55 60

gaa aaa tgc aac agt aac aac gac tac gaa gat cct gag ttc cag ctg 482

Glu Lys Cys Asn Ser Asn Asn Asp Tyr Glu Asp Pro Glu Phe Gln Leu

65 70 75

25 ctg aag gca tgg cca tca atg aaa att tta cca gcc aga cct atc cag 530

Leu Lys Ala Trp Pro Ser Met Lys Ile Leu Pro Ala Arg Pro Ile Gln

80 85 90

gaa tcg gaa tac gca gat aca cgc tat ttc cag gat atg atg gag gct 578

Glu Ser Glu Tyr Ala Asp Thr Arg Tyr Phe Gln Asp Met M t Glu Ala
 95 100 105
 ccc ctt ctg tta cct ccc aag gct tct gtc tcc act gag aga caa acc 626
 Pro Leu Leu Leu Pro Pro Lys Ala Ser Val Ser Thr Glu Arg Gln Thr
 5 110 115 120
 agg gagat gtg agg atg aca cag ctg gaa gaa gtg gac aag cct acc ttc 674
 Arg Asp Val Arg Met Thr Gln Leu Glu Glu Val Asp Lys Pro Thr Phe
 125 130 135 140
 aag gat gtc aga agc caa cgc ttt aaaa ggtt ttc aaa tac aca aaa ata 722
 10 Lys Asp Val Arg Ser Gln Arg Phe Lys Gly Phe Lys Tyr Thr Lys Ile
 145 150 155
 aac aag act cct ttg cca cct cct cgg cct gct atc act ctc ccc aag 770
 Asn Lys Thr Pro Leu Pro Pro Arg Pro Ala Ile Thr Leu Pro Lys
 160 165 170
 15 aag tac caa ccc tta ccc cca gca cca cca gag gag agc agt gca tac 818
 Lys Tyr Gln Pro Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Glu Ser Ser Ala Tyr
 175 180 185
 ttc gct cca aag ccc acc ttt cca gaa gtc cag agg ggg ccc agg cag 866
 Phe Ala Pro Lys Pro Thr Phe Pro Glu Val Gln Arg Gly Pro Arg Gln
 20 190 195 200
 agg agt gca aaa gac ttc agt agg gtc ctt gga gca gaa gaa gaa tct 914
 Arg Ser Ala Lys Asp Phe Ser Arg Val Leu Gly Ala Glu Glu Ser
 205 210 215 220
 cac cac cag aca aag cca gaa tct tct tgc cca tca tca aac caa aac 962
 25 His His Gln Thr Lys Pro Glu Ser Ser Cys Pro Ser Ser Asn Gln Asn
 225 230 235
 aca cag aag agt cca cct gcc att gcc agc tct tcc tac atg cca gga 1010
 Thr Gln Lys Ser Pro Pro Ala Ile Ala Ser Ser Ser Tyr Met Pro Gly

240 245 250
aag cac agt ata caa gcc aga gac cat aca ggt agc atg cag cac tgt 1058
Lys His Ser Ile Gln Ala Arg Asp His Thr Gly Ser Met Gln His Cys

255 260 265
5 cct gct cag aga tgc caa gct gca gcc agc cac agc cct cga atg ctg 1106
Pro Ala Gln Arg Cys Gln Ala Ala Ala Ser His Ser Pro Arg Met Leu

270 275 280
ccc tat gaa aac aca aac tcg gag aaa cct gac ccc aca aag cct gat 1154
Pro Tyr Glu Asn Thr Asn Ser Glu Lys Pro Asp Pro Thr Lys Pro Asp

10 285 290 295 300
10 gag aag gat gtc tgg cag aat gaa tgg tac att gga gaa tac agt cgc 1202
Glu Lys Asp Val Trp Gln Asn Glu Trp Tyr Ile Gly Glu Tyr Ser Arg

305 310 315
cag gca gtg gaa gat gtg tta atg aaa gag aac aag gat ggt act ttt 1250

15 Gln Ala Val Glu Asp Val Leu Met Lys Glu Asn Lys Asp Gly Thr Phe
320 325 330
ttg gtc cga gac tgc tct aca aaa tcc aag gca gaa cca tat gtt ttg 1298
Leu Val Arg Asp Cys Ser Thr Lys Ser Lys Ala Glu Pro Tyr Val Leu

335 340 345
20 gtg gtg ttt tat ggg aac aag gtc tac aat gtg aaa atc cgt ttc ctc 1346
Val Val Phe Tyr Gly Asn Lys Val Tyr Asn Val Lys Ile Arg Phe Leu

350 355 360
gag agc aat caa cag ttt gcc ctg ggc aca gga cta cga gga aat gag 1394
Glu Ser Asn Gln Gln Phe Ala Leu Gly Thr Gly Leu Arg Gly Asn Glu

25 365 370 375 380
25 atg ttt gat tct gtg gaa gac atc att gaa cac tac aca tat ttt ccc 1442
Met Phe Asp Ser Val Glu Asp Ile Ile Glu His Tyr Thr Tyr Phe Pro

385 390 395

att ctg cta ata gat ggg aaa gac aag gct gca cgc agg aaa cag tgc 1490

Ile Leu Leu Ile Asp Gly Lys Asp Lys Ala Ala Arg Arg Lys Gln Cys

400 405 410

tac ctc acc cag cca ctg cct ctc gcc agg ctc ctt ctc act cag tac 1538

5 Tyr Leu Thr Gln Pro Leu Pro Leu Ala Arg Leu Leu Leu Thr Gln Tyr

415 420 425

tcc agc cag gca ctt cat gag taa gaagcccagc cagatatccc cgcattcgtg 1592

Ser Ser Gln Ala Leu His Glu

430 435

10 gcctgggcct tgtctcattc ctggctcaat ggattcagtt cttttccat ctgcatttat 1652

ctgcaaaagta ttatttctg tgtcttcaag ggatgatttt ttgactctgt aaaaaaaaaa 1712

aaaaaaaaaa 1721

15 <210> 2

<211> 435

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

20 Met Thr Ser Gln Gly Asn Lys Arg Thr Thr Lys Glu Gly Phe Gly Asp

1 5 10 15

Leu Arg Phe Gln Asn Val Ser Leu Leu Lys Asn Arg Ser Trp Pro Ser

20 25 30

Leu Ser Ser Ala Lys Gly Arg Cys Arg Ala Val Leu Glu Pro Leu Pro

25 35 40 45

Asp His Arg Arg Asn Leu Ala Gly Val Pro Gly Glu Lys Cys Asn

50 55 60

Ser Asn Asn Asp Tyr Glu Asp Pro Glu Phe Gln Leu Lys Ala Trp

65 70 75 80
Pro Ser Met Lys Ile Leu Pro Ala Arg Pro Ile Gln Glu Ser Glu Tyr
85 90 95
Ala Asp Thr Arg Tyr Phe Gln Asp Met Met Glu Ala Pro Leu Leu
5 100 105 110
Pro Pro Lys Ala Ser Val Ser Thr Glu Arg Gln Thr Arg Asp Val Arg
115 120 125
Met Thr Gln Leu Glu Glu Val Asp Lys Pro Thr Phe Lys Asp Val Arg
130 135 140
10 145 150 155 160
Ser Gln Arg Phe Lys Gly Phe Lys Tyr Thr Lys Ile Asn Lys Thr Pro
Leu Pro Pro Pro Arg Pro Ala Ile Thr Leu Pro Lys Lys Tyr Gln Pro
165 170 175
Leu Pro Pro Ala Pro Pro Glu Glu Ser Ser Ala Tyr Phe Ala Pro Lys
15 180 185 190
Pro Thr Phe Pro Glu Val Gln Arg Gly Pro Arg Gln Arg Ser Ala Lys
195 200 205
Asp Phe Ser Arg Val Leu Gly Ala Glu Glu Ser His His Gln Thr
210 215 220
20 225 230 235 240
Lys Pro Glu Ser Ser Cys Pro Ser Ser Asn Gln Asn Thr Gln Lys Ser
Pro Pro Ala Ile Ala Ser Ser Ser Tyr Met Pro Gly Lys His Ser Ile
245 250 255
Gln Ala Arg Asp His Thr Gly Ser Met Gln His Cys Pro Ala Gln Arg
25 260 265 270
Cys Gln Ala Ala Ala Ser His Ser Pro Arg Met Leu Pro Tyr Glu Asn
275 280 285
Thr Asn Ser Glu Lys Pro Asp Pro Thr Lys Pro Asp Glu Lys Asp Val

290 295 300
Trp Gln Asn Glu Trp Tyr Ile Gly Glu Tyr Ser Arg Gln Ala Val Glu
305 310 315 320
Asp Val Leu Met Lys Glu Asn Lys Asp Gly Thr Phe Leu Val Arg Asp
5 325 330 335
Cys Ser Thr Lys Ser Lys Ala Glu Pro Tyr Val Leu Val Val Phe Tyr
340 345 350
Gly Asn Lys Val Tyr Asn Val Lys Ile Arg Phe Leu Glu Ser Asn Gln
355 360 365
10 Gln Phe Ala Leu Gly Thr Gly Leu Arg Gly Asn Glu Met Phe Asp Ser
370 375 380
Val Glu Asp Ile Ile Glu His Tyr Thr Tyr Phe Pro Ile Leu Leu Ile
385 390 395 400
Asp Gly Lys Asp Lys Ala Ala Arg Arg Lys Gln Cys Tyr Leu Thr Gln
15 405 410 415
Pro Leu Pro Leu Ala Arg Leu Leu Leu Thr Gln Tyr Ser Ser Gln Ala
420 425 430
Leu His Glu
435
20
<210> 3
<211> 1129
<212> DNA
25 <213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1128)

<300>

<301> Goitsuka R., et al., 1999, *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 13121-13126.

<302> A BASH/SLP-76-related adaptor protein MIST/Clink involved in IgE receptor-mediated mast cell degranulation

5 <303> *Int J Immunopharmacol*, 1999, 19, 103-110.

<304> 12

<305> 4

<306> 573-580

<307> 2000

10 <308> AB021220 *Int J Immunopharmacol*, 1999, 19, 103-110.

<309> 2000-05-26

<400> 3

ttc cag aac ttc agt ctg cca aaa aac agg tca tgg cct cgc atc aat 48

15 Phe Gln Asn Phe Ser Leu Pro Lys Asn Arg Ser Trp Pro Arg Ile Asn

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

agt gcc aca ggc cag tac cag agg atg aac aag cct ctt cta gac tgg 96

Ser Ala Thr Gly Gln Tyr Gln Arg Met Asn Lys Pro Leu Leu Asp Trp

16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

20 gaa aga aac ttt gct gca gtc ctg gat gga gca aaa ggc cac agt gat 144

Glu Arg Asn Phe Ala Ala Val Leu Asp Gly Ala Lys Gly His Ser Asp

31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45

gat gac tat gat gac cct gag ctt cgg atg gaa gag aca tgg cag tcg 192

Asp Asp Tyr Asp Asp Pro Glu Leu Arg Met Glu Glu Thr Trp Gln Ser

25 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64

att aaa att tta cca gcc cgg cct ata aag gaa tct gaa tat gca gat 240

Ile Lys Ile Leu Pro Ala Arg Pro Ile Lys Glu Ser Glu Tyr Ala Asp

65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80

aca cac tat ttc aag gtt gca atg gac act ccc ctt ccg tta gac acc 288
 Thr His Tyr Phe Lys Val Ala Met Asp Thr Pro Leu Pro Leu Asp Thr
 85 90 95
 agg acc tct atc tcc att gga cag ccg acc tgg aac aca cag acg agg 336
 5 Arg Thr Ser Ile Ser Ile Gly Gln Pro Thr Trp Asn Thr Gln Thr Arg
 100 105 110
 ttg gaa aga gtg gac aaa ccc att tcc agg gac gtc aga agc caa aac 384
 Leu Glu Arg Val Asp Lys Pro Ile Ser Arg Asp Val Arg Ser Gln Asn
 115 120 125
 10 att aaa gga gat gca tcc gta aga aag aac aag att cct tta cca cct 432
 Ile Lys Gly Asp Ala Ser Val Arg Lys Asn Lys Ile Pro Leu Pro Pro
 130 135 140
 cct cgg cct ctc ata aca ctt ccg aag aag tac caa ccc ttg ccc cct 480
 Pro Arg Pro Leu Ile Thr Leu Pro Lys Lys Tyr Gln Pro Leu Pro Pro
 15 145 150 155 160
 gag ccg gag agc agc agg cca cct tta tct cag aga cac acc ttt cca 528
 Glu Pro Glu Ser Ser Arg Pro Pro Leu Ser Gln Arg His Thr Phe Pro
 165 170 175
 gaa gtc cag gga atg ccc agt cag ata agc tta agg gac tta agt gag 576
 20 Glu Val Gln Gly Met Pro Ser Gln Ile Ser Leu Arg Asp Leu Ser Glu
 180 185 190
 gtc ctt gaa gca gaa aaa gtt cct cat aac cag agg aag cct gaa tca 624
 Val Leu Glu Ala Glu Lys Val Pro His Asn Gln Arg Lys Pro Glu Ser
 195 200 205
 25 act cat ctg tta gaa aac caa aat act caa gag att cca ctt gcc att 672
 Thr His Leu Leu Glu Asn Gln Asn Thr Gln Glu Ile Pro Leu Ala Ile
 210 215 220
 agc agt tct tca ttc acg aca agc aac cac agt gtg caa aac aga gat 720

Ser Ser Ser Ser Phe Thr Thr Ser Asn His Ser Val Gln Asn Arg Asp
 225 230 235 240
 cat aga gga ggc atg cag ccc tgt tct cct cag aga tgc cag cct cca 768
 His Arg Gly Gly Met Gln Pro Cys Ser Pro Gln Arg Cys Gln Pro Pro
 5 245 250 255
 gcc agc tgc agc cct cac gaa aat ata ctg ccc tat aaa tac aca agc 816
 Ala Ser Cys Ser Pro His Glu Asn Ile Leu Pro Tyr Lys Tyr Thr Ser
 260 265 270
 tgg aga cca cct ttc ccc aaa agg tct gat aga aag gat gtc cag cac 864
 10 Trp Arg Pro Pro Phe Pro Lys Arg Ser Asp Arg Lys Asp Val Gln His
 275 280 285
 aat gaa tgg tac att gga gaa tac agc cgc cag gca gtg gaa gag gca 912
 Asn Glu Trp Tyr Ile Gly Glu Tyr Ser Arg Gln Ala Val Glu Glu Ala
 290 295 300
 15 ttc atg aag gag aac aag gat ggt agt ttc ttg gtc cga gat tgt tcc 960
 Phe Met Lys Glu Asn Lys Asp Gly Ser Phe Leu Val Arg Asp Cys Ser
 305 310 315 320
 aca aaa tcc aag gaa gag ccc tat gtt ttg gct gtg ttt tat gag aac 1008
 Thr Lys Ser Lys Glu Glu Pro Tyr Val Leu Ala Val Phe Tyr Glu Asn
 20 325 330 335
 aaa gtc tac aat gta aaa atc cgc ttc ctg gag agg aat cag cag ttt 1056
 Lys Val Tyr Asn Val Lys Ile Arg Phe Leu Glu Arg Asn Gln Gln Phe
 340 345 350
 gcc ctg ggg aca gga ctc aga gga gat gag aag ttt gat tca gta gaa 1104
 25 Ala Leu Gly Thr Gly Leu Arg Gly Asp Glu Lys Phe Asp Ser Val Glu
 355 360 365
 gac atc atc gaa cac tac aag aat t 1129
 Asp Ile Ile Glu His Tyr Lys Asn

370

375

<210> 4

5 <211> 376

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Phe Gln Asn Phe Ser Leu Pro Lys Asn Arg Ser Trp Pro Arg Ile Asn

10

1

5

10

15

Ser Ala Thr Gly Gln Tyr Gln Arg Met Asn Lys Pro Leu Leu Asp Trp

20

25

30

Glu Arg Asn Phe Ala Ala Val Leu Asp Gly Ala Lys Gly His Ser Asp

35

40

45

15

Asp Asp Tyr Asp Asp Pro Glu Leu Arg Met Glu Glu Thr Trp Gln Ser

50

55

60

Ile Lys Ile Leu Pro Ala Arg Pro Ile Lys Glu Ser Glu Tyr Ala Asp

65

70

75

80

Thr His Tyr Phe Lys Val Ala Met Asp Thr Pro Leu Pro Leu Asp Thr

20

85

90

95

Arg Thr Ser Ile Ser Ile Gly Gln Pro Thr Trp Asn Thr Gln Thr Arg

100

105

110

Leu Glu Arg Val Asp Lys Pro Ile Ser Arg Asp Val Arg Ser Gln Asn

115

120

125

25

Ile Lys Gly Asp Ala Ser Val Arg Lys Asn Lys Ile Pro Leu Pro Pro

130

135

140

Pro Arg Pro Leu Ile Thr Leu Pro Lys Lys Tyr Gln Pro Leu Pro Pro

145

150

155

160

12/12/01

Glu Pro Glu Ser Ser Arg Pro Pro Leu Ser Gln Arg His Thr Phe Pro

165

170

175

Glu Val Gln Gly Met Pro Ser Gln Ile Ser Leu Arg Asp Leu Ser Glu

180

185

190

5 Val Leu Glu Ala Glu Lys Val Pro His Asn Gln Arg Lys Pro Glu Ser

195

200

205

Thr His Leu Leu Glu Asn Gln Asn Thr Gln Glu Ile Pro Leu Ala Ile

210

215

220

Ser Ser Ser Ser Phe Thr Thr Ser Asn His Ser Val Gln Asn Arg Asp

10 225

230

235

240

His Arg Gly Gly Met Gln Pro Cys Ser Pro Gln Arg Cys Gln Pro Pro

245

250

255

Ala Ser Cys Ser Pro His Glu Asn Ile Leu Pro Tyr Lys Tyr Thr Ser

260

265

270

15 Trp Arg Pro Pro Phe Pro Lys Arg Ser Asp Arg Lys Asp Val Gln His

275

280

285

Asn Glu Trp Tyr Ile Giy Glu Tyr Ser Arg Gln Ala Val Glu Glu Ala

290

295

300

Phe Met Lys Glu Asn Lys Asp Gly Ser Phe Leu Val Arg Asp Cys Ser

20 305

310

315

320

Thr Lys Ser Lys Glu Glu Pro Tyr Val Leu Ala Val Phe Tyr Glu Asn

325

330

335

Lys Val Tyr Asn Val Lys Ile Arg Phe Leu Glu Arg Asn Gln Gln Phe

340

345

350

25 Ala Leu Gly Thr Gly Leu Arg Gly Asp Glu Lys Phe Asp Ser Val Glu

355

360

365

Asp Ile Ile Glu His Tyr Lys Asn

370

375

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06351

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, 5/10, C07K14/52, 16/24,
G01N33/53, 33/577, C12P21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, 5/10, C07K14/52, 16/24,
G01N33/53, 33/577, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/Geneseq, PIR

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Goitsuka, R. et al., "A BASH/SLP-76-related adaptor protein MIST/Clnk involved in IgE receptor-mediated mast cell degranulation" International Immunology (2000), Vol. 12, No. 4, pp.573-580	1-10
PX	Goitsuka, R., "Mast Saibou ni Hatsugen suru BASH/SLP-76 Family Signal Dentatsu Bunshi", Igaku no Ayumi (2000), Vol.192, No.10, pp.1027-1031	1-10
PX	Ming Yu Cao, et al., "Cluk, a Novel SLP-76-related Adaptor Molesule Expressed in Cytokine-stimulated Hemopoietic Cells" J. Exp. Med. (November, 1999), Vol.190, No.10, pp.1527-1534	1-10
A	Goitsuka, R. et al., "Cutting Edge: BASH, A Novel Signaling Molecule Preferentially Expressed in B Cells of the Bursa of Fabricius" J. Immunol. (1998), Vol.161, pp.5804-5808	1-10
A	Jackman, K. J. et al., "Molecular Cloning of SLP-76, a 76-kDa Tyrosine Phosphoprotein Associated with Grb2 in T Cells" J. Biol. Chem. (1995), Vol.270, No.13, pp.7029-7032	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 November, 2000 (27.11.00)

Date of mailing of the international search report
05 December, 2000 (05.12.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/09, 5/10, C07K14/52, 16/24,
G01N33/53, 33/577, C12P21/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/09, 5/10, C07K14/52, 16/24,
G01N33/53, 33/577, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICSTファイル (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq, PIR

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Goitsuka, R. et al. "A BASH/SLP-76-related adaptor protein MIST /Clnk involved in IgE receptor-mediated mast cell degranulation" International Immunology (2000) 第12巻 第4号 p. 573-580	1-10
PX	後飯塚僚"マスト細胞に発現するBASH/SLP-76ファミリーシグナル伝達分子"医学のあゆみ (2000) 第192巻 第10号 p. 102 7-1031	1-10

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す
もの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日
以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する
文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって
出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論
の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに
よって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 11. 00

国際調査報告の発送日

05.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4N 9549

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
PX	Ming Yu Cao, et al. "Cluk, a Novel SLP-76-related Adaptor Mole sule Expressed in Cytokine-stimulated Hemopoietic Cells" J. E xp. Med. (1999, Nov.) 第190巻 第10号 p. 1527-1534	1-10
A	Goitsuka, R. et al. "Cutting Edge: BASH, A Novel Signaling Molec ule Preferentially Expressed in B Cells of the Bursa of Fabr icius" J. Immunol. (1998) 第161巻 p. 5804-5808	1-10
A	Jackman, K. J. et al. "Molecular Cloning of SLP-76, a 76-kDa Tyro sine Phosphoprotein Associated with Grb2 in T Cells" J. Biol. Chem. (1995) 第270巻 第13号 p. 7029-7032	1-10

THIS PAGE BLANK (USPTO)